

This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

A1

**DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

**N° 75 02743**

(54)

**Procédé et dispositif pour augmenter la perméabilité de la membrane des cellules des êtres vivants.**

(51)

Classification internationale (Int. Cl.<sup>2</sup>).

**C 12 K 9/00; B 01 D 13/00.**

(22)

Date de dépôt ..... **29 janvier 1975, à 14 h 59 mn.**

(33) (32) (31)

Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée en République Fédérale d'Allemagne le 2 février 1974, n. P 24 05 119.2 au nom de la demanderesse.*

(41)

Date de la mise à la disposition du public de la demande .....

**B.O.P.I. — «Listes» n. 35 du 29-8-1975.**

(71)

Déposant : Société dite : **KERNFORSCHUNGSANLAGE JULICH GESELLSCHAFT MIT BESCHRANKTER HAFTUNG**, résidant en République Fédérale d'Allemagne.

(72)

Invention de :

(73)

Titulaire : *Idem* (71)

(74)

Mandataire : **Cabinet A. Lourié et W. Flechner.**

228 ISK

L'invention concerne un procédé visant à augmenter la perméabilité de la membrane des cellules d'êtres vivants ainsi qu'un dispositif destiné à la mise en oeuvre du procédé.

Selon une proposition non publiée antérieurement, on introduit des cellules d'êtres vivants dans une solution qui contient des complexants ou des substances douées d'action catalytique et qui a une pression osmotique inférieure à celle du contenu cellulaire. Etant donné la perméabilité accrue de la membrane des cellules, il se produit un échange de matière entre la solution contenue à l'intérieur de la cellule et la solution qui contient les complexants ou les substances catalytiques. Ensuite, on augmente la pression osmotique de la solution qui contient les cellules en ajoutant des substances osmotiquement actives telles que des ions calcium, potassium et sodium, pour l'amener à la pression osmotique du contenu des cellules initialement introduites et la membrane cellulaire perd sa perméabilité aux complexants ou substances catalytiques contenues à l'intérieur de la cellule de sorte qu'elle les enferme. Des cellules traitées de cette façon et contenant des complexants servent à séparer d'une solution aqueuse des substances ionisées qui se distinguent par des propriétés chimiques ou physiques. On introduit les cellules contenant les complexants dans la solution aqueuse contenant les substances ionisées de sorte que celles-ci migrent à travers la membrane cellulaire et sont converties par les complexants en complexes difficilement dissociables ou difficilement solubles. En séparant les cellules de la solution aqueuse, on sépare donc aussi de la solution aqueuse les substances ionisées fixées dans les cellules.

On utilise des cellules contenant des substances douées d'action catalytique pour la synthèse ou la décomposition de substances contenues dans une solution aqueuse et qui se distinguent par des propriétés chimiques. On introduit les cellules dans la solution aqueuse jusqu'à ce que les substances contenues dans la solution et destinées à la synthèse ou à la décomposition migrent à l'intérieur des cellules par suite de la perméabilité de leur membrane, que la synthèse ou la décomposition soit terminée et que les substances aient migré à travers la membrane des cellules dans la solution aqueuse, après quoi on sépare de la solution aqueuse, de manière en elle-même connue, les produits de synthèse ou de décomposition.

Pourtant, l'opération proposée, qui assure l'aug-

mentation de la perméabilité et qui consiste à introduire les cellules dans une solution dont la pression osmotique est abaissée relativement à celle du contenu cellulaire, nécessite beaucoup de temps car l'augmentation de la perméabilité n'a lieu que lentement et en outre, il faut tenir compte de plusieurs grandeurs qui sont importantes pour l'opération. En outre, pour le cas où l'on utilise comme cellules des cellules bactériennes et où il est nécessaire d'éliminer la paroi cellulaire, il faut appliquer une étape supplémentaire en elle-même connue pour détacher la paroi.

L'invention a pour but de fournir un procédé permettant d'augmenter la perméabilité de la membrane des cellules des êtres vivants qui peut être pratiqué de façon simple, rapide et donc économique et dans lequel on obtient une augmentation de perméabilité qui permette un échange aussi poussé que possible de macromolécules ayant un rayon d'au moins 5 Å, contenues à l'intérieur des cellules et dans une solution dans laquelle on a introduit les cellules. Il faut que l'augmentation de perméabilité obtenue puisse être supprimée par une opération simple. Un autre but est de fournir un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé.

Dans un procédé du genre défini plus haut, ce problème est résolu suivant l'invention par le fait que l'on introduit les cellules sous la forme d'une suspension dans un liquide conducteur de l'électricité, formant une solution physiologique d'électrolyte et qui est à une température de 0 à 25°C, qu'ensuite on expose à un champ électrique la solution physiologique d'électrolyte ainsi formée, contenant les cellules, jusqu'à ce que des macromolécules ayant un rayon d'au moins 5 Å soient échangées, à travers la membrane cellulaire jouant le rôle d'une membrane d'osmose, entre la solution contenue à l'intérieur des cellules et la solution physiologique d'électrolyte. L'intensité du champ qui assure l'augmentation de perméabilité est de préférence d'environ  $10^3$  à  $10^5$  V/cm.

Le procédé selon l'invention peut être mis en oeuvre sous forme discontinue ou continue. Pour la mise en oeuvre du procédé discontinu, on remplit d'une solution physiologique d'électrolyte qui contient en suspension des cellules d'êtres vivants un récipient dans lequel sont disposées deux électrodes et on applique une impulsion électrique à la solution d'électrolyte. Pour la mise en oeuvre continue du procédé selon l'invention, dans un

recipient rempli d'une solution physiologique d'électrolyte et aux électrodes duquel est appliqué un champ électrique constant, on fait passer à travers le champ électrique la solution physiologique d'électrolyte contenant les cellules en suspension. A cet effet, avantageusement, on amène en continu au recipient la solution physiologique d'électrolyte neuve contenant les cellules en suspension et en même temps, on aspire du recipient la solution d'électrolyte contenant les cellules exposées au champ électrique. En même temps, on dissipe la chaleur engendrée dans le champ électrique au sein de la solution d'électrolyte. Selon un autre mode opératoire très avantageux, on fait passer la solution physiologique d'électrolyte contenant les cellules en suspension par le foyer d'un champ électrique concentré. On tire ainsi mieux parti du champ électrique et en même temps, on assure que les cellules entraînées à travers le champ électrique soient toutes exposées à une intensité de champ à peu près égale.

Il est apparu que le temps de séjour nécessaire à l'augmentation de la perméabilité de la membrane des cellules, dans le champ électrique qui assure cette augmentation, est si court que l'on peut obtenir de façon simple et rapide et en outre avec un rendement élevé des cellules dont la membrane a une perméabilité accrue.

Une variante avantageuse du procédé selon l'invention consiste en ce que l'on fait passer la solution physiologique d'électrolyte contenant les cellules à travers une ouverture entourant le foyer du champ électrique et prévue dans une paroi formée de matière non conductrice de l'électricité, disposée entre les électrodes du champ électrique. On obtient ainsi une utilisation encore meilleure du champ électrique et toutes les cellules sont pratiquement exposées au même champ électrique. Mais en même temps, on arrive aussi à ce que l'échange de macromolécules à travers la membrane cellulaire se déroule encore plus complètement. Cela se reconnaît, par exemple lorsqu'on utilise des érythrocytes, à la coloration de liquide électrolytique par l'hémoglobine qui sort de l'intérieur des cellules et à la coloration des érythrocytes.

Le procédé selon l'invention peut être avantageusement mis en œuvre au moyen d'un dispositif du genre défini plus haut, caractérisé par le fait qu'il comporte un recipient divisé en deux chambres par une cloison qui est formée d'une matière non conductrice de l'électricité telle que la verre etc.

BAD ORIGINAL

et présente un passage d'un diamètre d'au moins  $10 \mu$ , que dans  
 chacune des chambres est disposée une électrode, que la  
 paroi du récipient, entourant les chambres, présente des raccords-  
 ents de tuyauterie pour l'amenée de solution physiologique  
 d'électrolyte, que dans l'une des chambres pénètre un ajutage  
 d'amenée traversant la paroi du récipient, dirigée vers le  
 passage et destinée à la solution physiologique contenant les  
 cellules et que dans l'autre chambre pénètre un tuyau  
 traversant la paroi du récipient, également dirigé vers le passage  
 et destiné à aspirer la solution physiologique d'électrolyte  
 qui contient les cellules. Pour la mise en oeuvre du procédé selon  
 l'invention, on calcule selon le débit désiré le diamètre et la  
 longueur du passage et le champ électrique appliqué aux électrodes,  
 de manière à assurer l'augmentation voulue de la perméabilité de  
 la membrane des cellules.

Selon une variante avantageuse, un dispositif destiné  
 à la mise en oeuvre du procédé selon l'invention est caractérisé  
 par le fait qu'il comporte trois récipients (10, 11, 12) en matière  
 non conductrice de l'électricité telle que le verre etc., disposés  
 concentriquement l'un dans l'autre, formant une chambre extérieure,  
 une chambre intermédiaire et une chambre intérieure, que le récipient  
 extérieur présente deux raccordements de tuyauterie  
 pour l'amenée de solution physiologique d'électrolyte et pour la  
 désaération, que dans le récipient extérieur est prévue une  
 traversée électrique pour les électrodes disposées dans la  
 chambre extérieure, que dans le centre du fond du récipient exté-  
 rieur pénètre une tuse destinée à l'amenée de la solu-  
 tion physiologique d'électrolyte contenant les cellules, qu'à la  
 partie supérieure du récipient intermédiaire sont prévus un  
 raccordement de tuyauterie destiné à l'amenée de solution phy-  
 siologique d'électrolyte et une traversée électrique destinée aux  
 électrodes intérieures qui sont disposées dans la chambre in-  
 termédiaire concentriquement aux électrodes extérieures, que  
 le récipient intermédiaire présente au fond un passage  
 placé en face de l'ouverture de l'ajutage d'amenée, présen-  
 tant un diamètre d'au moins  $20 \mu$ , que dans la partie supérieure du  
 récipient intérieur sont prévus un raccordement de tuyauterie  
 destiné à l'aspiration de solution d'électrolyte contenant les  
 cellules et une traversée destinée à un thermocouple ou organe  
 similaire et que le récipient intérieur présente, en son fond,

une ouverture (17) située en face de la buse d'amenée (15) et du passage (16) prévu au fond du récipient intermédiaire.

Il est apparu que l'on peut supprimer l'augmentation de perméabilité de la membrane des cellules en chauffant pendant 1  
5 à 2 heures à une température de 15 à 40°C la solution qui contient les cellules. Lorsqu'on utilise des cellules bactériennes, on chauffe de préférence les cellules à une température de 20°C et lorsqu'on utilise des érythrocytes, on les chauffe de préférence à environ 37°C. Du fait que la perméabilité accrue de la membrane  
10 cellulaire peut être supprimée, les cellules peuvent servir à absorber des macromolécules de la nature la plus diverse et donc, servir à différentes applications.

Par conséquent, on peut aussi utiliser avantageusement les cellules d'êtres vivants obtenues selon l'invention dans des  
15 procédés visant à séparer, d'un mélange de substances qui est dissous dans une solution aqueuse contenant au moins 0,5 millimoles d'ions magnésium et/ou calcium plus des ions potassium comme l'eau de mer, l'eau douce, les eaux usées etc..., des corps ionisés qui se distinguent par des propriétés chimiques ou physiques,  
20 par exemple des ions de métaux lourds, etc., en utilisant des complexants organiques ou minéraux facilitant la séparation et qui entrent en combinaison avec les corps à séparer. On met les cellules dans une solution contenant les complexants et dont la pression osmotique s'écarte dans une certaine mesure de celle du contenu  
25 cellulaire des cellules primitives et de celle de la solution aqueuse, jusqu'à ce que par suite d'échange de matière à travers la membrane cellulaire, à l'état d'équilibre entre la solution contenue à l'intérieur des cellules et la solution qui contient les complexants, le contenu cellulaire corresponde pratiquement à la  
30 solution qui contient les complexants. Ensuite pour supprimer l'augmentation de perméabilité, après avoir chauffé à une température de 15 à 40°C la solution qui contient les cellules, on la maintient à cette température environ 1 à 2 heures. Ensuite, on sépare les cellules contenant le complexant de la solution contenant les  
35 complexants. Ensuite, pour enrichir en substances ionisées la solution aqueuse, on place les cellules dans la solution aqueuse jusqu'à ce que les substances ionisées qu'il s'agit de séparer de la solution aqueuse aient migré vers l'intérieur des cellules à travers la membrane cellulaire et aient été converties par les complexants en complexes difficilement dissociables ou difficilement so-  
40



lubles. En une autre étape en elle-même connue, on sépare alors les cellules de la solution aqueuse.

Les cellules d'êtres vivants préparées par le procédé selon l'invention peuvent aussi servir avantageusement dans des  
5 procédés de synthèse et de décomposition de substances se distinguant par des propriétés chimiques, dissoutes dans une solution contenant au moins 0,5 millimole d'ions magnésium et/ou calcium plus des ions potassium, au moyen de substances douées d'action catalytique et favorisant la synthèse ou la décomposition. On met les  
10 cellules dans une solution contenant des substances douées d'action catalytique et dont la pression osmotique s'écarte dans une certaine mesure du contenu cellulaire des cellules primitives et de celle de la solution aqueuse, jusqu'à ce que, par suite de la perméabilité accrue de la membrane cellulaire et par échange de matière entre la  
15 solution contenue à l'intérieur des cellules et la solution qui contient les substances douées d'action catalytique, le contenu cellulaire corresponde pratiquement à la solution qui contient les substances catalytiques. Ensuite, après avoir chauffé à une température de 15 à 40°C la solution contenant les cellules, on la maintient à cette température environ 1 à 2 heures. Ensuite, on sépare les cellules contenant les substances catalytiques de la solution contenant les substances catalytiques. Pour la pratique du procédé de synthèse ou de décomposition de substances, on introduit alors les cellules dans la solution aqueuse jusqu'à ce que les substances  
25 destinées à la synthèse ou à la décomposition et contenues dans la solution aqueuse aient migré à travers la membrane des cellules à l'intérieur de celles-ci, que la synthèse ou la décomposition soit terminée et que les substances aient migré à travers la membrane des cellules dans la solution aqueuse. On sépare alors de la solution aqueuse, de manière en elle-même connue, les produits de synthèse ou de décomposition.

A titre d'exemple on a décrit ci-dessous et représenté au dessin annexé deux formes de réalisation d'un dispositif pour la mise en oeuvre du procédé suivant l'invention.

55 La figure 1 montre un dispositif selon l'invention, formé d'un récipient divisé en deux chambres par une cloison ;

La figure 2 un dispositif selon l'invention formé de trois récipients disposés concentriquement l'un dans l'autre.

Comme le montre la figure 1, le récipient 1 est subdivisé en deux chambres 4 et 5 par une cloison 2 présentant un  
40

passage 1. Dans chacune des chambres 4 et 5 est disposée une électrode 6. Sur la paroi du récipient sont prévus des raccords de tuyauterie 7 permettant d'amener séparément aux chambres 4 et 5 de la solution physiologique d'électrolyte. Pour la pratique du procédé selon l'invention, on fait arriver de l'extérieur à la chambre 4 par la buse d'amenée de la solution physiologique d'électrolyte contenant les cellules, on l'aspire à nouveau hors du récipient 1 par le tube d'aspiration 5 à travers le passage 5 qui entoure le foyer du champ électrique et on la recueille dans un récipient collecteur refroidi, interposé avant la pompe aspirante et non représenté sur la figure 1. La perte de solution physiologique d'électrolyte est compensée par les tuyaux d'amenée 7.

La figure 2 montre un dispositif plus perfectionné selon l'invention qui se compose de trois récipients 10, 11 et 12 disposés concentriquement l'un dans l'autre, formant des chambres extérieure, intermédiaire et intérieure. Dans les chambres extérieure et intermédiaire sont disposées les électrodes 13 et 14. Pour la mise en oeuvre du procédé selon l'invention, on amène à la chambre extérieure par l'ajutage 15 la solution d'électrolyte contenant les cellules et on la fait passer par le passage 16 prévu dans le récipient intermédiaire 11 et entourant le foyer du champ électrique et par une ouverture 17 prévue dans le récipient intérieur. A cet effet, on aspire de la solution d'électrolyte par le raccord 18. Les cellules aspirées sont recueillies dans un récipient collecteur refroidi, interposé avant la pompe aspirante et non représenté sur la figure 2. La perte de solution physiologique d'électrolyte qui se produit pendant les opérations dans le dispositif est compensée par les raccords 19 et 20. Le raccord 21 sert simplement à désaérer le dispositif. Pour éviter un chauffage trop prononcé qui endommagerait les cellules, un thermocouple 22 est prévu dans la chambre intérieure pour régler la température.

#### Exemple d'exécution

On recueille environ 100 ml de sang de boeuf frais dans une solution isotonique de citrate de sodium et on centrifuge à 1200 g la solution obtenue, dans une centrifugeuse. Ensuite, on lave à deux reprises, en centrifugeant à chaque fois, environ 50 ml des érythrocytes concentrés séparés par centrifugation dans 100 ml d'une solution tampon contenant, par litre, 150 millimoles de NaCl, 10 millimoles de KCl, 4 millimoles de  $MgCl_2$ , 2 millimoles

de  $\text{CaCl}_2$  et 5 millimoles de 2-amino-2-hydroxyméthylpropanediol (1,3) et dont on a ajusté le pH à 7,4 par addition d'acide chlorhydrique. Ensuite, on dilue le concentré d'érythrocytes en un rapport de 10 : 5 au moyen d'une solution tampon à laquelle on a  
5 ajoute 1 millimole/l de triphosphate d'adénosine.

Ensuite on aspire la solution contenant les érythrocytes à travers l'ajutage d'amenée 15 d'un dispositif selon la figure 2, auquel on amène en même temps de la solution tampon refroidie à 0°C et servant de solution physiologique électrolytique. Le  
10 diamètre et la longueur du passage 16 prévu dans le récipient intermédiaire 11 ainsi que la distance entre l'extrémité de l'ajutage d'amenée 15 et le passage 16 mesurent 0,45 mm. Aux électrodes est appliquée une tension de 550 V. Le début de passage des érythrocytes à travers le dispositif est calculé de façon telle que la  
15 quantité d'érythrocytes introduite passe par le dispositif en 30 minutes environ. On sépare par centrifugation à 0°C et 13 000 g, en l'espace de 15 minutes environ, les érythrocytes recueillis dans le récipient collecteur.

Ensuite, on met en suspension 0,5 ml des érythrocytes  
20 séparés par centrifugation dans une solution comprenant 5 ml de solution tampon et 0,2 ml d'une solution d'albumine iodée  $^{131}\text{I}$  dont l'activité spécifique est de 0,1 mCi/ml et on maintient environ une heure à 0°C. Ensuite, on chauffe la solution et on la maintient environ 2 heures à 37°C. Ensuite, on centrifuge les érythrocytes pendant 15 minutes à 13 000 g et on les lave à deux reprises, en centrifugeant à chaque fois, dans une solution tampon  
25 contenant 0,1 % d'albumine comme véhicule. On mesure l'activité du  $^{131}\text{I}$  restant dans les érythrocytes, après désagregation de ceux-ci, dans un détecteur à scintillation à liquide du type commercialisé sous la dénomination BRICARD. L'activité mesurée correspond à une absorption de 51 % de  $^{131}\text{I}$  par les érythrocytes aux dépens de la solution contenant de l'albumine iodée.  
30

REVENDEICATIONS

1) Procédé pour augmenter la perméabilité de la membrane de cellules d'êtres vivants, caractérisé par le fait que l'on introduit les cellules sous la forme d'une suspension dans un liquide conducteur de l'électricité, formant une solution physiologique d'électrolyte et qui est à une température de 0 à 25°C, qu'ensuite on expose à un champ électrique la solution physiologique d'électrolyte ainsi formée, contenant les cellules, jusqu'à ce que des macromolécules ayant un rayon d'au moins 5 Å soient échangées, à travers la membrane cellulaire jouant le rôle d'une membrane d'osmose, entre la solution contenue à l'intérieur des cellules et la solution physiologique d'électrolyte.

2) Procédé suivant la revendication 1, caractérisé par le fait que l'on fait passer la solution physiologique d'électrolyte contenant les cellules par le foyer d'un champ électrique concentré.

3) Procédé suivant la revendication 2, caractérisé par le fait que l'on fait passer la solution physiologique d'électrolyte contenant les cellules à travers une ouverture entourant le foyer du champ électrique et prévue dans une paroi en matériau non conducteur d'électricité, disposée entre les électrodes du champ électrique.

4) Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé suivant l'ensemble des revendications 1 à 3 et caractérisé par le fait qu'il comporte un récipient (1) divisé en deux chambres (4,5) par une cloison (2) qui est formée d'une matière non conductrice de l'électricité telle que le verre, etc. et présente un passage (3) d'un diamètre d'au moins 20  $\mu$ , que dans chacune des chambres (4,5) est disposée une électrode (6), que la paroi du récipient, entourant les chambres, présente des raccordements de tuyauterie (7) pour l'amenée de solution physiologique d'électrolyte, que dans l'une des chambres (4) pénètre un ajutage d'amenée (8) traversant la paroi du récipient, dirigée vers le passage (3) et destinée à la solution physiologique contenant les cellules et que dans l'autre chambre (5) pénètre un tuyau (9) traversant la paroi du récipient, également dirigé vers le passage (3) et destiné à aspirer la solution physiologique d'électrolyte qui contient les cellules.

5) Dispositif pour la mise en oeuvre du procédé suivant l'ensemble des revendications 1 à 3 et caractérisé par le fait qu'il comporte trois récipients (10, 11, 12) en matière non conductrice de

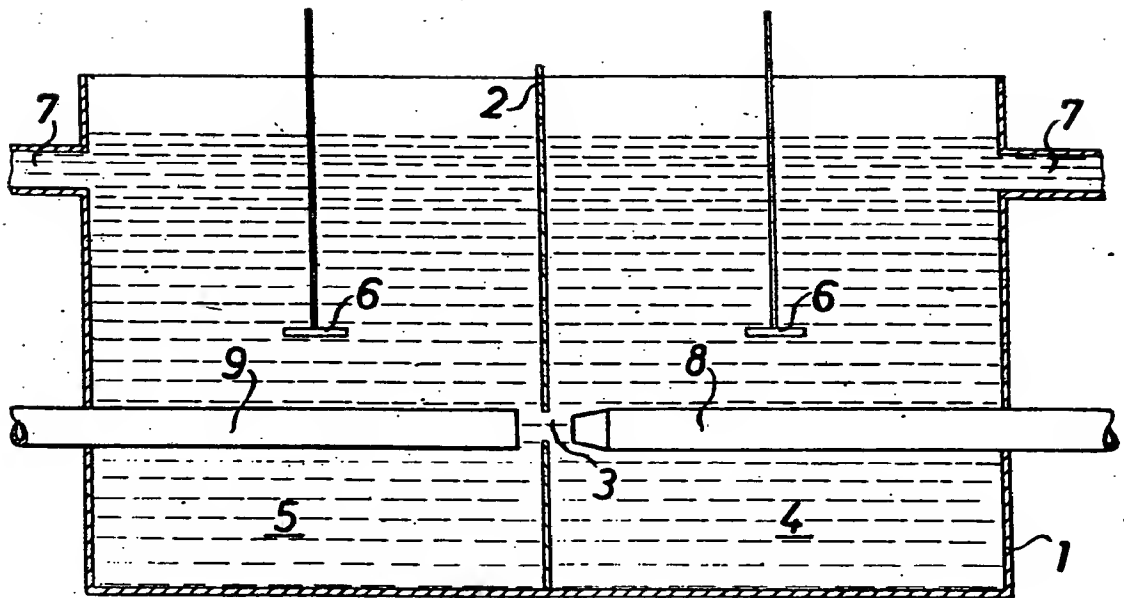
2259904

l'électricité telle que le verre etc., disposés concentriquement l'un dans l'autre, formant une chambre extérieure, une chambre intermédiaire et une chambre intérieure, que le récipient extérieur (10) présente deux raccords de tuyauterie (19,21) pour l'amenée de solution physiologique d'électrolyte et pour la désaération, que dans le récipient extérieur (10) est prévue une traversée électrique pour les électrodes (15) disposées dans la chambre extérieure, que dans le centre du fond du récipient extérieur (10) pénètre une buse (15) destinée à l'amenée de la solution physiologique d'électrolyte contenant les cellules, qu'à la partie supérieure du récipient intermédiaire (11) sont prévus un raccordement de tuyauterie (20) destiné à l'amenée de solution physiologique d'électrolyte et une traversée électrique destinée aux électrodes intérieures (14) qui sont disposées dans la chambre intermédiaire concentriquement aux électrodes extérieures (13), que le récipient intermédiaire (11) présente au fond un passage (16) placé en face de l'ouverture de l'ajutage d'amenée (15), présentant un diamètre d'au moins 20  $\mu$ , que dans la partie supérieure du récipient intérieur (12) sont prévus un raccordement de tuyauterie (18) destiné à l'aspiration de solution d'électrolyte contenant les cellules et une traversée destinée à un thermocouple (22) ou organe similaire et que le récipient intérieur (12) présente, en son fond, une ouverture (17) située en face de la buse d'amenée (15) et du passage (16) prévu au fond du récipient intermédiaire.

BAD ORIGINAL

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

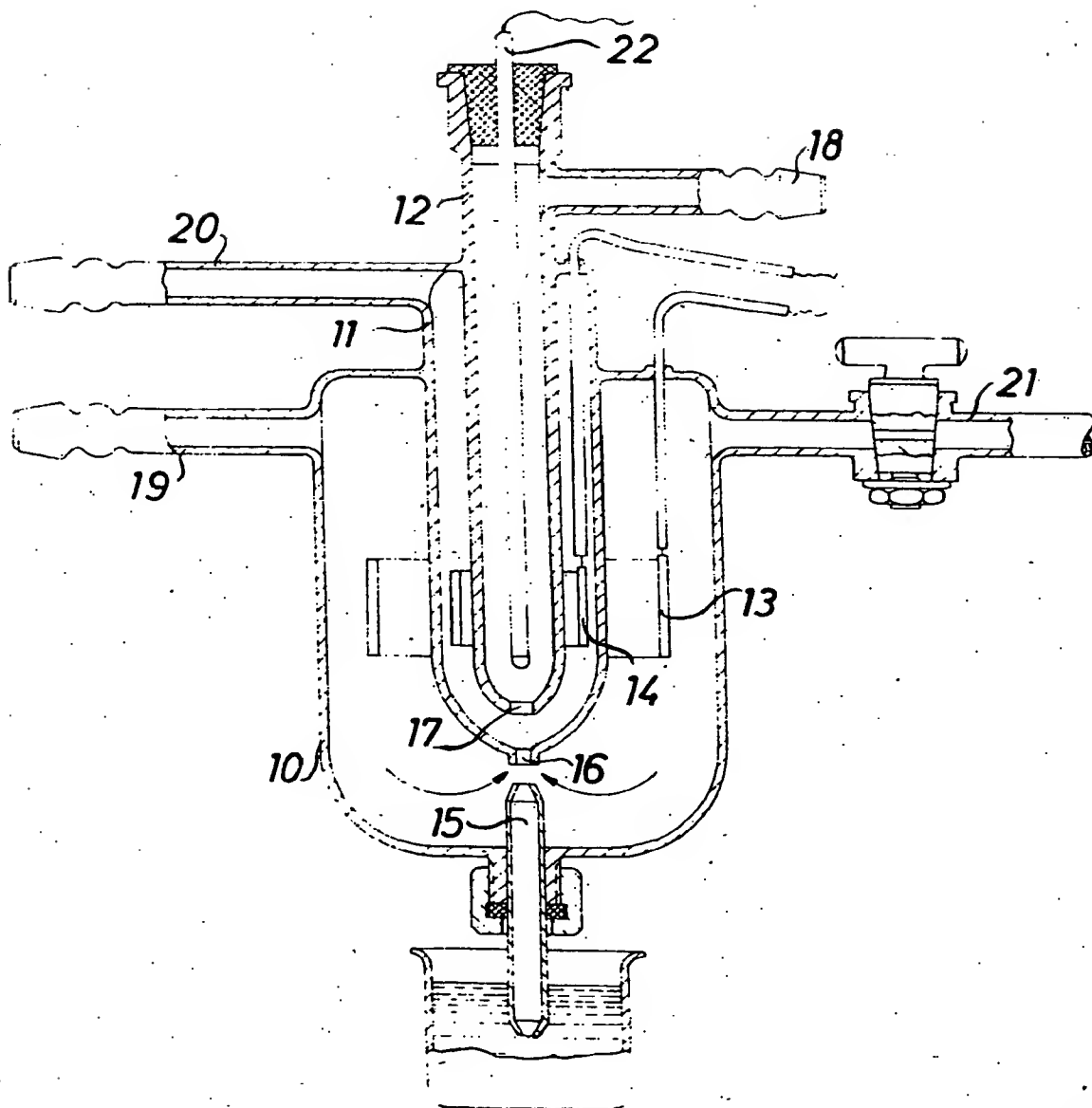
FIG.1



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



FIG. 2



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**